

平成 21 年 5 月 23 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17590691
 研究課題名 (和文) 慢性膵炎における膵線維化の病態解明
 -Smad3 のトランスジェニックマウス作製-
 研究課題名 (英文) Elucidation of pathological mechanism of the pancreatic fibrosis in
 chronic pancreatitis.
 研究代表者
 中村 早人 (NAKAMURA HAYATO)
 産業医科大学 医学部・准教授
 研究者番号：90207902

研究成果の概要：

慢性膵炎の病因および病態を解明するうえで膵臓の線維化機序を検討することは重要である。Smad3 は線維化に関与していることが知られており、膵においても Smad3 の発現亢進により、線維化の増悪が予想される。Smad3 導入遺伝子レポーターベクターは、テトラサイクリン応答因子を有するレポーターベクターに Smad3 の cDNA を組み込んだマウスを作製した。Smad3 を組み込んだマウスは 16 匹が得られ、PCRにて 8 匹 (8 系統) が確認できた。F1 では 8 系統の内、5 系統のマウスを得ることができた。F2 では、3 系統が継代可能であり、今後表現型などを検討する予定である。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	2,700,000	0	2,700,000
2006 年度	500,000	0	500,000
2007 年度	400,000	120,000	520,000
2008 年度	400,000	120,000	520,000
総計	4,000,000	240,000	4,240,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・消化器内科

キーワード:膵線維化、慢性膵炎、TGF-beta、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

慢性膵炎の組織学的特徴は、膵実質のび慢性、時には限局性の炎症性破壊、消失に伴う不規則な線維化であり、慢性膵炎の病因および病態を解明するうえで膵臓の線維化機序を検討することは重要である。膵臓の線維化に関しては、ヒトの慢性膵炎の病理組織学的検討は精力的になされているが、細胞レベルでの検討はなされていない。我々はラット急性膵炎モデルにおいて TGF- β が重要な役割を果たしていることを報告してきた。TGF- β の刺激が細胞外から伝達されると II 型および I 型受容体は細胞表面に複合体を作って活性化される。その複合体に

Smad2 や Smad3 は結合して活性化され、Smad4 とともに核内に移行し、DNA のプロモーター領域に作用して遺伝子の発現に関与していると考えられている。Smad6 は Smad2 の作用を抑制する働きを持つと考えられ、我々は Smad6 Tg マウスの作製を計画し、確立した。

膵における TGF- β の作用は、Smad2 よりも Smad3 を経由していることが判明し、最近の研究では肺や腎臓に生じる線維化では多くの場合、Smad3 の発現が亢進していることが判明しており、膵においても Smad3 の発現増強により、線維化をきたしてくると予想される。

2. 研究の目的

TGF- β の Tg マウスでも腭線維化がみられるが、TGF- β の作用として、線維化だけでなく免疫系への影響もあり、より線維化に関与するといわれている Smad3 の発現を亢進させて線維化モデルを作製することは有用と考えられ、Smad3 Tg マウスを作製して、Smad3 の腭線維化の関与を解明する。

3. 研究の方法

(1) Smad3 導入遺伝子の作製

プラスミドベクターの作製のため、Smad3 の cDNA をプロモーターやポリ A 領域をもつプラスミド発現ベクターに組み込む。ゲノム DNA を用いたほうが発現効率良好と思われるが、そうすると組み込む DNA が非常に長くなるために、今回は cDNA を用いた。

発現効率をあげるために、Smad3 cDNA の下流にイントロンを含む β -グロビンの一部も同時に組み込んだ。

プロモーターの候補としては、腭、肝、大腸に特異的発現が予想される MT1 を用いる予定である。飲水中に硫酸亜鉛を混入させることにより、Smad3 の発現を増強させる予定である。そうすることにより、胎生期における遺伝子導入の影響を緩和できる。MT1 プロモーター以外にも、全身に発現が認められる CMV プロモーターや肺に特異的発現が認められる surfactant protein C (SP-C) プロモーターと ciliated cell 特異的プロモーター、消化器系で発現が強く認められるメタロチオネイン 1 プロモーター、腭外分泌系で発現がみられるエラスターゼ 1 プロモーター、胃や十二指腸や腭の上皮で発現がみられる trefoil peptide プロモーター-pS2、ラ島で発現がみられるグルカゴンやインスリンプロモーターなども検討した。それぞれのプロモーター領域などを適当な制限酵素によって DNA を切断し、回収した。

(2) 作製した DNA を受精卵へ導入

交尾を確認した採卵用雌マウスの卵管から受精卵を取り出した。その時、排卵数を増やすためラットに性腺刺激ホルモンを投与することにより、過排卵を誘発した。ホールディングピペットで卵を吸入して固定した後、インジェクションピペットにて受精卵の前核へ、あらかじめ調整した DNA を微量注入した。選択する DNA については数種類に限定する予定である。偽妊娠の里親マウスの後背部から卵巣、卵管、子宮をつまみだした。インジェクションした30-40個の卵をトランスファーピペットにて吸い上げた後、実体顕微鏡下で卵管開口部にトランスファーピペットを挿入してそれらの卵を注入した。

(3) Smad3 Tg マウスの表現型

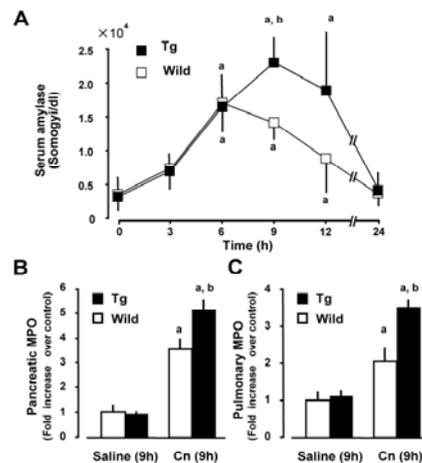
生まれてきた仔がトランスジェニックマウスであるかどうかを確認するためにマウスの尾部から DNA を抽出し、PCR 法にて Smad3 DNA の存在

を確かめた。安定して繁殖が可能であると判断した場合には、導入したプロモーターの特性にあわせて臓器を摘出し、それぞれの臓器での Smad3 の発現が強い系を選択し、表現型について検討した。

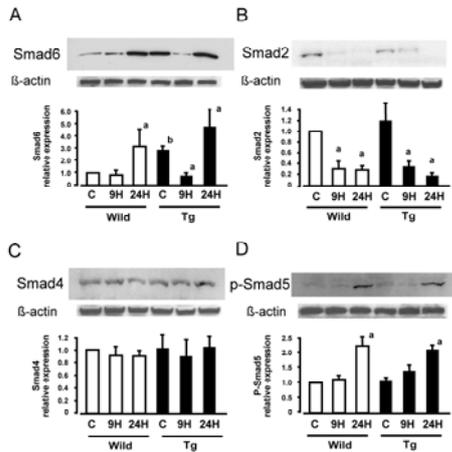
4. 研究成果

慢性膵炎の組織学的特徴は、膵実質のび慢性、時には限局性の炎症性破壊、消失に伴う不規則な線維化であり、慢性膵炎の病因および病態を解明するうえで膵臓の線維化機序を検討することは重要である。膵における TGF- β の作用は、Smad2 よりも Smad3 を経由していることが判明しており、膵においても Smad3 の発現増強により、線維化をきたしてくると予想される。

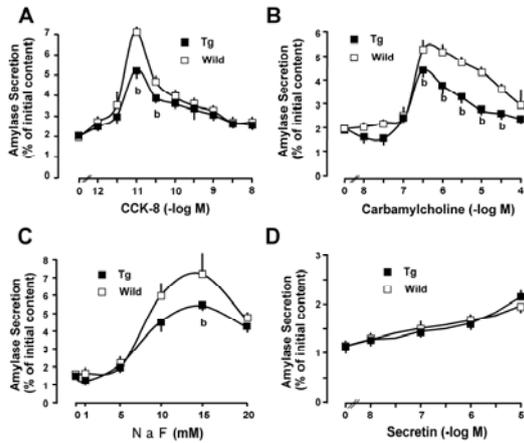
臓器特異性をもたせ、必要な時期に発現を亢進させるために、クローンテック社製の Tet-On システムを用いた。プロモーターベクターはラットエラスターゼ I のプロモーター領域を pTet-On vector CMV プロモーター領域の部分を組み換えることにより作製し、Smad3 導入遺伝子レポーターベクターは、テトラサイクリン応答因子を有するレポーターベクターに Smad3 の cDNA を組み込んだものを作製した。この二種類のベクターをマウス受精卵(200 個以上)ずつに導入した。プロモーター領域を組み込んだマウスは27匹が得られ、PCRにて、5 匹(5 系統)の Tg マウスが確認できた。Smad3 を含むレポーターベクターを組み込んだマウスは16匹が得られ、PCRにて8 匹(8 系統)の Tg マウスが確認できた。この作製できた Tg マウスの表現型などを調べるために、継代可能な系を確立することに力を注いだ。F1 では8 系統の内、5 系統のマウスを得ることができた。F2では、3 系統が継代可能であった。



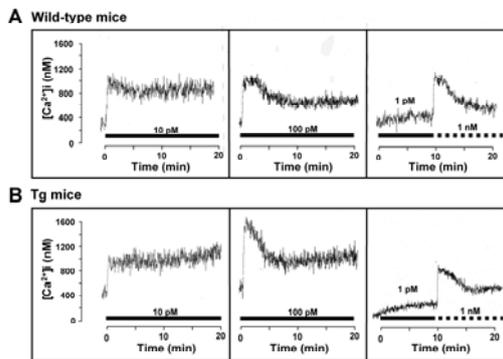
Smad6 Tg マウスにセルレイン膵炎を惹起させると前図のように血漿中のアミラーゼの上昇はより増強され、膵臓および肺におけるMPO活性もより強くなるため、Tgマウスでは膵炎の重症度が増すことが判明した。Smad6 に関する予備実験を行い、GUT に投稿し、論文として発表した。



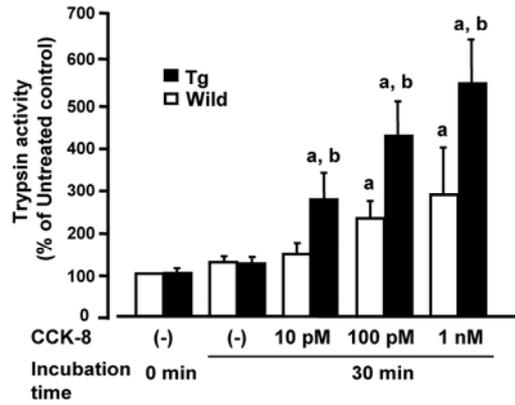
セルレイン膵炎前後における Smad6 および他の Smad の膵内の発現では、Smad6 が膵炎後、強く誘導されることが判明した。



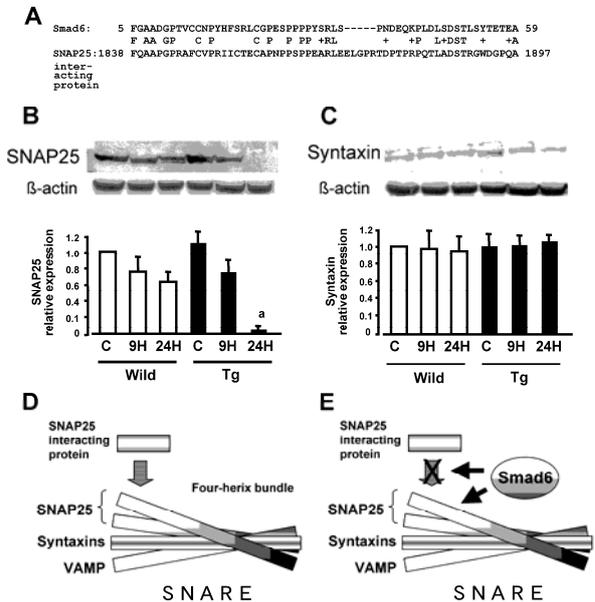
Smad6 Tg の膵腺房細胞では、CCKやセクレチン刺激によるアミラーゼ分泌が低下していることを認めた。



CCKなどの刺激後の細胞内カルシウム濃度の測定にて、TgマウスとWildマウスとの明らかな違いは認められなかった。このことにより、Tgマウスのアミラーゼ分泌の低下の原因はカルシウム作用部位よりも末梢に存在することが判明した。



膵内のトリプシン活性はTgマウスの膵炎後により強く増強されていることが判明し、その活性増強により、膵炎が悪化していることが分かった。トリプシン活性の増強は、膵酵素分泌異常が関与していることが予想された。

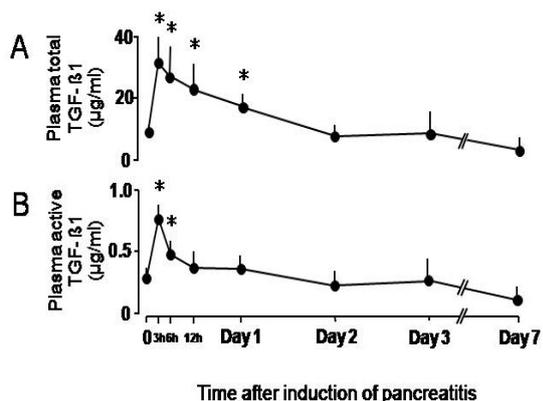


Smad6タンパク質のアミノ酸配列は、膵酵素分泌に関与しているSNAP25 関与タンパク質と類似しており、この類似性のために分泌が傷害されている可能性が示唆された。

膵炎では様々なサイトカインが放出されるが、サイトカインのひとつとして Transforming growth factor(TGF)-beta があげられ、TGF-beta をブロックすることにより、膵腺房細胞の障害を抑え、膵線維化を抑えることを報告してきた。

TGF-beta は活性化されるためには、いくつかのステップを経ることが必要であるが、急性膵炎における細胞外基質の発現には血漿中のTGF-beta の増加と、特に活性化したTGF-beta の増加が重要であることを示した(以下の図)(Nakamura H et al. pancreas 2007)。また、細胞障害や線維化の抑制に対して、細胞外から作用するTGF-beta の働きを抑制する必要がある

ことを報告した。



TGF-beta 作用の抑制を目的に当初、抑制因子として発表された Smad6 を強発現するトランスジェニックマウスを作製したが、実際には TGF-beta 作用を抑制できず、逆に膵炎は悪化した(Nakamura H et al. GUT 2008)。

今後もこの 3 系統の表現型について精査を続けていく予定であり、さらには膵炎を惹起させて、膵線維化の変化を観察して、その結果を発表していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

① Nakamura H, Tashiro M, Asaumi H, Nomiya Y, Kaku M, Watanabe S, Miyamoto T, Otsuki M. Increased expression of Smad6 deteriorates murine acute experimental pancreatitis in two models. Gut. 2008; 57(6): 788-98. (査読あり)

② Nakamura H, Tashiro M, Yamaguchi T, Asaumi H, Nomiya Y, Watanabe S, Nagashio Y, Miyamoto T, Otsuki M. Preferential increase of extracellular matrix expression relative to transforming growth factor beta1 in the pancreas during the early stage of acute hemorrhagic pancreatitis in rats. Pancreas. 2007;35(4):e23-9. (査読あり)

③ Nomiya Y, Tashiro M, Yamaguchi T, Watanabe S, Taguchi M, Asaumi H, Nakamura H, Otsuki M. High glucose activates rat pancreatic stellate cells through protein kinase C and p38 mitogen-activated protein kinase pathway. Pancreas. 2007; 34(3): 364-72. (査読あり)

④ Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, Tashiro M, Nagashio Y, Nomiya Y, Nakamura H, Otsuki M. Green tea polyphenol(-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits ethanol-induced activation of pancreatic stellate cells. M. Eur J Clin Invest. 2006; 36(2): 113-22. (査読あり)

⑤ Yamaguchi T, Kihara Y, Taguchi M, Nagashio Y, Tashiro M, Nakamura H, Otsuki M. Persistent destruction of the basement membrane of the pancreatic duct contributes to progressive acinar atrophy in rats with experimentally induced pancreatitis. Pancreas. 2005; 31(4): 365-72. (査読あり)

[学会発表](計 4件)

① Hayato Nakamura, Hiroshi Asaumi, Yoko Nomiya, Shiro Watanabe and Makoto Otsuki. Increased Expression of Smad6 Deteriorates Murine Acute Pancreatitis. DDW2008 San Diego (May 18, 2008)

② Nakamura H, Tashiro M, Asaumi H, Nomiya Y, Watanabe S, Miyamoto T, Otsuki M. Increased expression of Smad6 deteriorates murine Acute edematous pancreatitis. 7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association Edinburgh, Scotland (Sep 3, 2006)

③ 中村 早人, 角 みどり, 田代 充生, 大槻 眞. Smad6 トランスジェニック・マウスにおける action dynamics とアミラーゼ分泌反応. 第 47 回 日本消化器病学会大会 神戸 (Oct 5, 2005)

④ 中村 早人, 角 みどり, 田代 充生, 大槻 眞. Smad6 トランスジェニック・マウスにおけるアミラーゼ分泌反応と膵内トリプシン活性化. 第 36 回 日本膵臓学会大会 東京 (July 29, 2005)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 早人 (NAKAMURA HAYATO)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号:90207902

(2)研究分担者

大槻 眞 (OTSUKI MAKOTO)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号:00030916

(3)連携研究者

なし